



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**  
**PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA**

**COSTO DE LA RESPUESTA INMUNE Y SUPERVIVENCIA DE LA HORMIGA  
CORTADORA DE HOJAS *Atta cephalotes* EN INFECCIONES CON EL HONGO  
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium brunneum*.**

**Por:**  
**ERNESTO BONADIES**

**PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ**

**2018**

57

**COSTO DE LA RESPUESTA INMUNE Y SUPERVIVENCIA DE LA HORMIGA  
CORTADORA DE HOJAS *Atta cephalotes* EN INFECCIONES CON EL HONGO  
ENTOMOPATOGENO *Metarhizium brunneum***


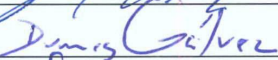

**TESIS**

Sometida para optar al título de Maestro en Ciencias con especialización en Entomología  
General

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

Permiso para su publicación y reproducción total o parcial debe ser sometido en la  
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado.

APROBADO:

	ASESOR
	JURADO
	JURADO

16 ABR 2019

Obsequio Puntos

*Este trabajo lo dedico a mi familia y amigos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis asesores de tesis. Especialmente a Hermógenes Fernández por su disposición y tiempo al asesorarme durante mi formación académica.

A los profesores, compañeros y personal del programa centroamericano de maestría en entomología. En especial a Vickelda Perez por su excepcional amabilidad.

A William Wcislo, Rachel Crisp, Hanna Marti, Yuliana Christopher, Celi Gonzales, Dumas Gálvez, Jennifer Thompson, Julián Reina, Manuel Rincón, Guillermo Antonio Lecaro, mis hermanos y padres por su ayuda en diferentes etapas de la elaboración de mi proyecto de tesis.

A la Fundacion Deveaux, INDICASAT, STRI, Universidad de Panamá, SENACYT, IST Austria por brindarme asesoramiento técnico y facilidades para realizar mi investigación.



## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	2
CAPITULO I      INTRODUCCIÓN .....	4
OBJETIVOS .....	10
HIPOTESIS DE TRABAJO .....	10
CAPITULO II      MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
CAPITULO III      RESULTADOS .....	33
CAPITULO IV      DISCUSION .....	39
CAPITULO V      CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	43
CAPITULO VI      BIBLIOGRAFIA .....	45

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Resultados de análisis post hoc de la escala de grises de los tratamientos 0 horas, 21 horas y control. a) Tukeys HSD y b) LSD ..... 35
Cuadro 2.	Valores de p de la comparación por pares usando la prueba Log Rank test a 0.05 de significancia. Valores < 0.05 marcados en negrita ..... 37

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Exterior de un nido de <i>Atta cephalotes</i> . Flechas rojas señalando entradas al nido. a) múltiples entradas. b) detalle de una entrada .....	12
Fig. 2.	Recamara subterránea de nido de <i>Atta cephalotes</i> . Flecha roja señalando el hongo simbionte de las hormigas .....	13
Fig. 3.	Partes de una colonia montada en laboratorio .....	15
Fig. 4.	<i>Metarhizium brunneum</i> . a) Cultivo en medio PDA con conidios color verde agregadas en diferentes áreas del plato Petri. b) Agregado de conidios con aumento 5X .....	18
Fig. 5.	Subcolonia. Plato Petri con hormigas (circulo verde), hongo simbionte (círculo rojo), papel toalla húmedo (flecha azul) .....	20
Fig. 6.	Resumen cronológico de los pasos realizados en los tratamientos 21 horas, 0 horas y el control en un lapso de 0 a 24 horas en hormigas con implante de nylon .....	23
Fig. 7.	Estéreo microscopio con caja acoplada. A) Caja con tapa abierta con portaobjetos adentro. B) Caja cerrada con tapa cerrada .....	25
Fig. 8.	Distribución de residuos producto de una prueba de analisis de varianza (ANOVA) en . a) Grafico Q-Q. b) Histograma .....	26
Fig. 9.	Curva de supervivencia de virulencia y el ajuste de concentración de conidios de <i>M. brunneum</i> . Los 3 diferentes tratamientos corresponden a 3 diferentes concentraciones de conidios de <i>M. brunneum</i> .....	29
Fig. 10.	Pellets producidos (izquierda) y germinados (derecha) en subcolonias inoculadas con <i>M. brunneum</i> a 0 y 21 horas.....	33
Fig. 11.	Porcentaje de germinación de pellets para tratamiento 0 y 21 horas .....	34
Fig. 12.	Escala de grises de los nylon de los tratamientos 0 horas, 21 horas y control.....	35
Fig. 13.	Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de obreras de <i>A. cephalotes</i> expuestas a 6 diferentes tratamientos durante un periodo de 10 días .....	36

## RESUMEN

Los insectos sociales (hormigas, termitas y algunas especies de abejas y avispas) son considerados exitosos por afrontar problemas en grupo. Sin embargo, por vivir en altas densidades de individuos, con una alta tasa de contacto, y una baja diversidad genética, las enfermedades son un gran desafío para estos insectos. Vivir en sociedad puede promover la propagación de parásitos entre miembros de la colonia. Para evitar una epidemia, los insectos sociales poseen estrategias de limpieza cooperativa entre miembros de una misma colonia, lo que se conoce como inmunidad social. Pero cuando un parásito infecta a un individuo, se activan respuestas de su sistema inmune innato. No se comprende bien la interacción entre inmunidad social e inmunidad innata. Por lo que se necesita estudiar el rol de cada uno de estos mecanismos de defensa. En este trabajo quiero entender el rol de la inmunidad innata, específicamente sobre el costo por el cual la inmunidad puede ser comprometida. Para esto diseñé dos experimentos utilizando la hormiga cortadora de hojas *Atta cephalotes* como organismo de estudio. Los experimentos incluyeron: 1) comprometer al sistema inmune de las hormigas durante infecciones con el hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* en diferentes momentos de un lapso de tiempo y medir la respuesta de melanización. 2) determinar la tasa de supervivencia de hormigas infectadas con *M. brunneum* teniendo el sistema inmune comprometido. Mis resultados muestran que comprometer el sistema inmune al mismo tiempo que las hormigas limpian la infección de *M. brunneum* puede inducir un costo que se vio reflejado en la capacidad de melanizar. Además, comprometer el sistema inmune disminuyó la supervivencia de las hormigas infectadas con entomopatógeno. Es posible que el éxito defensivo de los insectos sociales contra patógenos resida en sus estrategias de inmunidad social.

## SUMMARY

Social insects (ants, termites and some bees and wasp species) are considered a successful group due to cooperative problem solving. However, living in a nest with a high density of individuals, high genetic relatedness between nest mates, and sharing resources are traits that make disease a challenge for these insects. Living in societies may promote disease spread between members of the colony. To avoid disease outbreaks, social insects have cooperative cleaning strategies between members of the same colony; this is known as "social immunity". Nevertheless, when a parasite infects an individual from the colony, immune responses enter into play. Interactions between innate and social immune systems are not well understood. This makes it important to study each of these defense mechanisms. In this research, I want to understand the innate immunity role, specifically the cost of compromising it. Two experiments were designed using the leaf-cutting ant species *Atta cephalotes* as the study organism. The experiments included 1) compromise *A. cephalotes* workers' immune system during an infection with the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* to measure the melanization response. 2) Determine the survival rate from *A. cephalotes* with immune system compromised and infected with *M. brunneum*. My results show that compromising the immune system at the same time the ants clean *M. brunneum* infection has a cost, which was seen on the melanization capacity of the workers. Also, compromising the immune system decreased the ants' survival infected with *M. brunneum*. The ant defensive success against entomopathogens is possible due to social immunity strategies.

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

Los insectos verdaderamente sociales o eusociales son un grupo compuesto en su gran mayoría por termitas, hormigas y algunas especies de abejas y de avispas. Estos insectos viven en grupo y tienen en común que cuidan a sus crías de manera cooperativa, albergan a varias generaciones de adultos en un mismo tiempo en la misma colonia y poseen una división de labores entre una casta reproductiva y una no reproductiva. (Hölldobler y Wilson 2009).

Como colectivo, los insectos sociales suman más de 16 mil especies y representando solo el 2% del total de especies de insectos, pero corresponden a la mitad de la biomasa mundial de insectos (Bolton, 2018; Chapman y Bourke, 2001; Engel y Krishna, 2009). Están distribuidos en casi todo el planeta con excepción de lugares con climas extremos y algunas islas oceánicas. Y se les encuentra tanto en la naturaleza como en ecosistemas modificados por el humano haciendo las funciones de polinizadores de plantas, depredadores, carroñeros, herbívoros, y descomponedores de madera (Hölldobler y Wilson, 2009; Wilson, 1990).

Por su distribución cosmopolita, capacidad de modificar el medio ambiente y su diversidad de hábitos alimenticios, los insectos sociales son considerados un grupo exitoso (Wilson, 1990). Vivir en sociedad les ha brindado a estos insectos ciertas ventajas. Tareas como la búsqueda de alimento, construcción de nidos y la defensa contra depredadores se pueden ser realizadas por varios individuos teniendo un mayor impacto del que tendría un solo individuo (Hölldobler, 1981; Wilson, 1975).

Sin embargo, vivir en sociedad también tiene sus desafíos. Los insectos sociales son hospederos de una variedad de macro parásitos y patógenos. Además, viven en grupos de individuos genéticamente similares que comparten recursos e interactúan en un mismo espacio. Practican algunos comportamientos sociales como la trofilaxis, con la cual los adultos comparten alimentos a las larvas de la misma colonia (Wheeler, 1918). Estas características convierten a los insectos sociales en un sistema ideal para la rápida proliferación de enfermedades. (Hamilton, 1987; Schmid-Hempel, 1995).

Para evitar la proliferación de parásitos en sus colonias, los insectos sociales han desarrollado estrategias cooperativas de detección, prevención y limpieza de elementos nocivos. A este concepto se le conoce como “inmunidad social” (Cremer et al., 2007). Existe evidencia empírica del impacto de la inmunidad social en reducir la carga parasítica y aumentan la supervivencia de la colonia. Por ejemplo, cuando individuos de la colonia mueren, sus cadáveres son un recurso que puede ser aprovechado por microparásitos. Preventivamente, las obreras de diferentes especies de abejas, hormigas y termitas practican la remoción colectiva de cadáveres de la colonia (Visscher, 1983; Haskins y Haskins, 1974; Neoh et al., 2012). Además, si las obreras detectan la presencia de parásitos, estas pueden acicalar activamente a otros miembros de la colonia o superficies del nido contaminadas (Yanagawa y Shimizu, 2007; Ugelvig et al., 2010). Como también pueden auto-acicalarse de manera proactiva antes de entrar en contacto con otros elementos de la colonia para evitar contaminarlos con elementos nocivos (Morelos-Juárez et al., 2010) Se conoce que algunos insectos sociales sintetizan compuestos en glándulas especializadas que al ser aplicados en áreas contaminadas inhiben el crecimiento de micro parásitos (Fernández-Marín et al., 2015; Tragust et al., 2013, He et al., 2018; Pull et al., 2018).



Aunque la práctica de comportamientos de limpieza entre miembros de la colonia reduce la proliferación de parásitos y aumenta la supervivencia, no es un método infalible. Debido a las condiciones impuestas entre los parásitos y sus hospederos, la evolución de caracteres para evitar y controlar el parásito, van muchas veces acompañados por la capacidad de invadir y engañar al hospedero. Esta coevolución, se ha desarrollado como ejemplo de una constante coadaptaciones entre los cambios impuestos por el hospedero o el parásito y la respuesta adaptativa a los primeros cambios. Esto es conocido como un “evolutionary arm race” (evolución de la carrera armamentística) (Dawkins y Krebs, 1979). A través de este proceso algunos parásitos logran sobrepasar las barreras defensivas que brinda la inmunidad social y colonizar el cuerpo de los miembros de la colonia. Una vez que esto sucede los parásitos tienen que lidiar con defensas presentes en el cuerpo del hospedero. Se conoce que algunas características pasivas de la cutícula de los insectos, como el grosor y concentración de melanina (Wilson et al., 2001), o la presencia de ciertos lípidos y proteínas limitan el crecimiento de hongos entomopatógenos y aumentan la supervivencia del hospedero (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013).

Si el parásito logra atravesar la cutícula o entra a la cavidad corporal por el sistema digestivo, el cuerpo del insecto hospedero tiene una línea de defensa adicional llamada inmunidad innata. Este responde a señales de estrés de los tejidos activada por la colonización del cuerpo del hospedero por un parásito (Silva-Jothy y Rolff, 2005)

La inmunidad innata esta tradicionalmente dividida en 2 tipos, respuesta humoral y celular. La respuesta de defensa humoral está compuesta por moléculas efectoras solubles que pueden ser transportadas en la hemolinfa o a través de la cutícula, como los péptidos

anti microbiales y especies reactivas de oxígeno (Beckage, 2007; Boman y Hultmark, 1987). En general estas moléculas efectoras son liberadas por tejidos especializados para combatir protozoarios, hongos y bacterias (Bulet et al., 1999). Las moléculas efectoras poseen varios mecanismos de acción en los cuales se ha reportado que inducen apoptosis, inhiben la síntesis de proteínas, causando daños estructurales o permeabilización de la membrana del parásito (Lee y Lee, 2015).

La respuesta celular es la parte de la defensa innata mediada por diferentes tipos de células sanguíneas de la hemolinfa de los insectos, llamadas hemocitos. Se caracteriza por tener una función defensiva generalista, ya que actúa sobre cuerpos extraños que los hemocitos no reconozcan como parte del hospedero. Hemocitos especializados como los plasmocitos y granulocitos se encargan de fagocitar a hongos unicelulares y bacterias. Parásitos que no puedan ser fagocitados por su tamaño, son rodeados de células alargadas y pegajosas llamadas lamelocitos. Estos cubren por completo al parásito formando una cápsula, la cual usualmente produce melanina por acción de una cascada de reacciones en la que se encuentra presente la enzima fenol oxidasa. La cápsula melanizada formada por los hemocitos crea un ambiente con características citotóxicas para el parásito (Boman y Hultmark, 1987; Strand, 2008; Lu y Leger, 2016).

Debido a la diversidad y complejidad del repertorio defensivo de los insectos sociales, se entiende que las interacciones entre la inmunidad social e innata deben ser coordinadas, aditivas, costosas, pero no se entiende del todo bien cómo operan entre ellas. Hay evidencia de una reducción de genes relacionados a inmunidad innata en algunas abejas (Evans et al., 2006) y hormigas (Suen et al., 2011), en comparación con insectos de

vida solitaria. Además, insectos que viven en sociedades con un gran número de individuos tienen una menor respuesta celular inmune que insectos de vida solitaria pertenecientes a grupos hermanos (López-Urbe et al., 2016). Usar las defensas que brindan la inmunidad social y la inmunidad innata parece ser una buena estrategia para combatir todas las etapas epidemiológicas de la proliferación de parásitos. Sin embargo, las colonias de insectos sociales cuentan con recursos limitados (Schmid-Hempel, 2000). Y se desconocen los costos de la inmunidad innata dentro del “presupuesto” defensivo en colonias de insectos sociales.

En este trabajo me planteé desarrollar la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el costo de comprometer el sistema inmune en hormigas individuales de colonias de un insecto social, como *Atta cephalotes*, (Linneaus, 1758) durante una infección con un entomopatógeno generalista? Para entender los costos de usar el sistema inmune innato en la defensa contra microparásitos, se puede comprometer el sistema inmune implantando pedazos de hilo nylon para simular a un cuerpo extraño en la cavidad corporal de obreras de la especie de hormiga *A. cephalotes*. Esta acción involucra un uso de recursos metabólicos (Freitak et al., 2003). En un primer experimento se quiso entender el costo para el sistema inmune de manejar una infección con el hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* (Petch, 1935), midiendo la melanización de los implantes de hilo nylon. Mientras que en un segundo experimento se cuantificó la supervivencia de las obreras infectadas con *M. brunneum* para entender el costo de comprometer el sistema inmune en la supervivencia de obreras de *A. cephalotes*.

Decidí utilizar una especie de hormiga cortadora de hoja, *Atta cephalotes* (Formicidae, Attini) para mis experimentos debido que es un buen sistema de estudio de enfermedades en insectos sociales por las siguientes razones. a) Según Holldobler y Wilson (2009) estas hormigas viven en sociedades complejas, caracterizadas por un gran número de individuos que en algunas especies pueden llegar a tener más de un millón de obreras. b) Muestran una marcada división de labores y polimorfismo entre las obreras. c) Poseen simbiosis con bacterias y hongos. Estas incluyen bacterias que crecen en su cutícula y ayudan a prevenir la proliferación de algunos micro-parásitos. Y también un hongo (Basidiomycota, Agaricaceae, *Leucocoprinus*) simbionte que las hormigas cultivan como fuente de alimento principal de las crías y al que alimentan con material vegetal. d) Por su capacidad defoliadora son consideradas plaga agrícola y especies clave en su ecosistema, por lo que se ha estudiado extensamente su historia natural (Wirth et al., 2013). e) Se han realizado anteriormente experimentos para entender los costos de melanizar implantes de nylon en reinas (Baer et al., 2006). f) Se ha estudiado su fisiología y comportamiento para la eliminación de parásitos, como el uso y rol de secreciones de las glándulas metapleurales durante infecciones con micro-parásitos (Fernández Marín et al., 2006; Fernández-Marín et al., 2015; Poulsen et al., 2002).

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Determinar el costo de comprometer el sistema inmune innato durante una infección con entomopatógeno.

### **Específicos**

- Identificar diferencias en la melanización del sistema inmune de hormigas con infecciones de entomopatógeno a diferentes tiempos.
- Calcular la mortalidad y supervivencia de hormigas con el sistema inmune comprometido en infecciones con entomopatógeno.

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

Manejar una infección con entomopatógenos mientras se compromete al sistema inmune tendrá un costo metabólico y un impacto en la supervivencia de las hormigas.

**CAPITULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y mantenimiento de las colonias

Para todos los experimentos se utilizaron colonias recolectadas en campo de la especie de hormiga cultivadora de hongo *Atta cephalotes*. Como sitio de coleta se eligió un bosque secundario húmedo tropical ubicado en la localidad de Gamboa, Provincia de Colón, República de Panamá.

En total se recolectaron 10 colonias. Durante la temporada seca, entre los meses de enero y abril del año 2017, se recolectaron 7 colonias para el primer experimento. Durante la estación lluviosa en octubre del año 2017 se recolectaron otras 3 colonias para el segundo experimento. Se seleccionaron en campo colonias maduras que tuvieran varias entradas (Fig. 1), nidos de más de 200 metros de área, y el comportamiento de salidas de soldados luego de un disturbio.

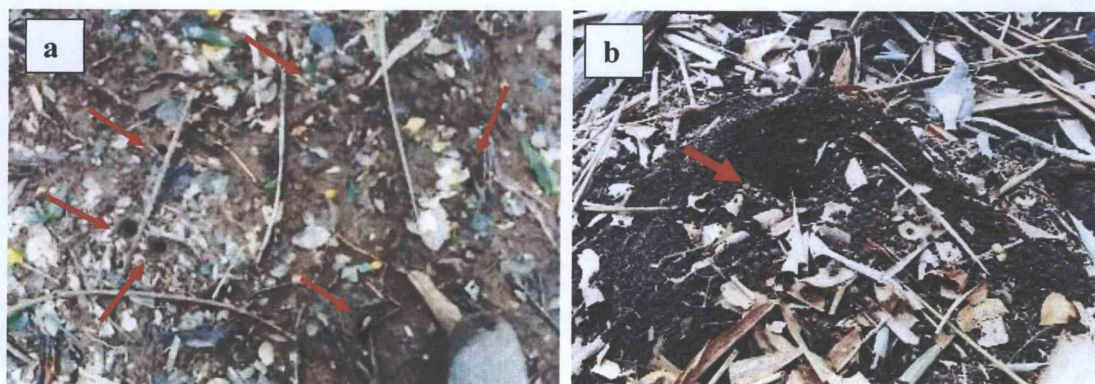


Fig. 1. Exterior de un nido de *Atta cephalotes*. Flechas rojas señalando entradas al nido. a) múltiples entradas. b) detalle de una entrada.

Usando las entradas de los nidos como punto de referencia se cavó con una pica de construcción, una piqueta geológica y pala de jardinería en el suelo contiguo a las entradas del nido. Utilizando un cuchillo y tijeras de jardinería se cortaron raíces que bloqueaban el acceso a las recamaras subterráneas del nido. Y con una espátula y una pala de jardinería se colectó la mayor cantidad de hongo simbiote y hormigas por recamara (Fig. 2).



Fig. 2. Recamara subterránea de nido de *Atta cephalotes*. Flecha roja señalando el hongo simbiote de las hormigas.



Las hormigas recolectadas incluían diferentes castas y estados de desarrollo (ej. larvas, pupas y adultos). Tanto el hongo simbiote como las hormigas fueron colocadas en un recipiente de plástico impregnado de talco sin aroma en la superficie superior interna del recipiente para evitar que las hormigas escaparan. El recipiente se intentaba llenar con hongo simbiote y hormigas hasta aproximadamente 5 centímetros por debajo de su volumen máximo, permitiendo recolectar aproximadamente hasta 3 litros de hongo simbiote, hormigas y escombros del nido. Una vez recolectadas, las colonias fueron transportadas a pie a los laboratorios del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) ubicados en la localidad de Gamboa.

Al llegar al laboratorio después de la recolecta, las hormigas, el hongo simbiote y escombros del nido eran colocados individualmente en un envase plástico con un orificio lateral de aproximadamente  $2\text{cm}^2$  y de tapa plástica removible. Este envase se colocaba dentro de otro envase plástico más grande impregnado con talco sin aroma en la mitad superior de la superficie lateral-interna para evitar que las hormigas escaparan (Figura 3). Las hormigas podían moverse libremente entre ambos envases para disponer sus desperdicios (ej. hojas secas, remanentes de tierra, obreras muertas, fragmentos de hongo simbiote viejo o enfermo) en el envase externo, los cuales eran limpiados manualmente 2 veces por semana.



Fig. 3. Partes de una colonia montada en laboratorio.

Para mantener la humedad se colocó un pedazo de papel toalla húmedo dentro del envase interno, el cual era reemplazado cuando se secaba o se ensuciaba. Las colonias eran alimentadas 3 veces por semana con hojas nuevas de las especies de árbol *Mangifera indica* (Linneus, 1753) y *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. Eventualmente se les proveía a las hormigas de hojuelas de avena maceradas.

### Hongo entomopatógeno

Para estimular comportamientos de limpieza e inducir mortalidad en las colonias de *A. cephalotes*, se utilizó la especie de hongo entomopatógeno generalista *Metarhizium brunneum*.

Se utilizó una especie del género *Metarhizium* spp. por su extenso uso para inducir mortalidad en experimentos con insectos sociales, incluyendo su uso en hormigas cortadoras de hoja (Loreto y Hughes, 2016). También porque se conocen algunos aspectos de su biología como su morfología, ciclo de vida (Hajek y Leger, 1994; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013), diversidad de especies y filogenia (Kepler et al., 2014). Además, el esfuerzo y los costos para mantener los cultivos en condiciones de laboratorio son bajos (Bonadies, comentario personal).

La cepa de *M. brunneum* seleccionada fue originalmente aislada de la cutícula de una reina de *Atta* sp. encontrada muerta en campo. Esta cepa ha sido utilizada previamente en experimentos de comportamientos de diferentes especies de hormigas cultivadoras de hongo (Fernandez-Marin et al. 2015; Bonadies et. al., en preparación).

*M. brunneum* fue cultivado en platos Petri de 92 milímetros (mm) de diámetro x 13 mm de alto con agar papa dextrosa (PDA) a 25 grados centígrados. Aproximadamente cada 3 meses se hacían pases a platos de cultivo nuevos para asegurarse de tener cultivos frescos disponibles. Cuando se realizaba un pase a un nuevo plato se dejaba crecer el micelio hasta que el hongo produjera conidios (esporas reproductivas asexuales), distinguibles del micelio siendo vistas con un esteroscopio (Fig. 4).

Los hongos del género *Metarhizium spp.* se consideran generalistas porque no está especializados en un solo hospedero. En la naturaleza se encuentra asociado como endófitos de raíces de plantas o como patógeno de artrópodos. Se ha reportado creciendo en más de 200 especies de artrópodos incluyendo insectos y arácnidos (Moore et al., 2011).

El ciclo de vida de *Metarhizium spp.* comienza cuando un conidio entra en contacto con la cutícula de un arthropodo hospedero. El conidio se ancla a la cutícula por efecto electrostático e interacciones químicas, y empieza a germinar. Del conidio sale una estructura llamada yema de germinación que crece y forma una apresoria. Esta empieza a penetrar la cutícula mediante degradación enzimática y presión mecánica. Una vez en el hemocele *Metarhizium spp.* se empieza a propagar en forma de células llamadas blastosporos por la cavidad corporal. Se alimenta de los nutrientes que encuentra, produce toxinas que debilitan al hospedero y finalmente produce la muerte del hospedero (Hajek y Leger, 1994; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013).



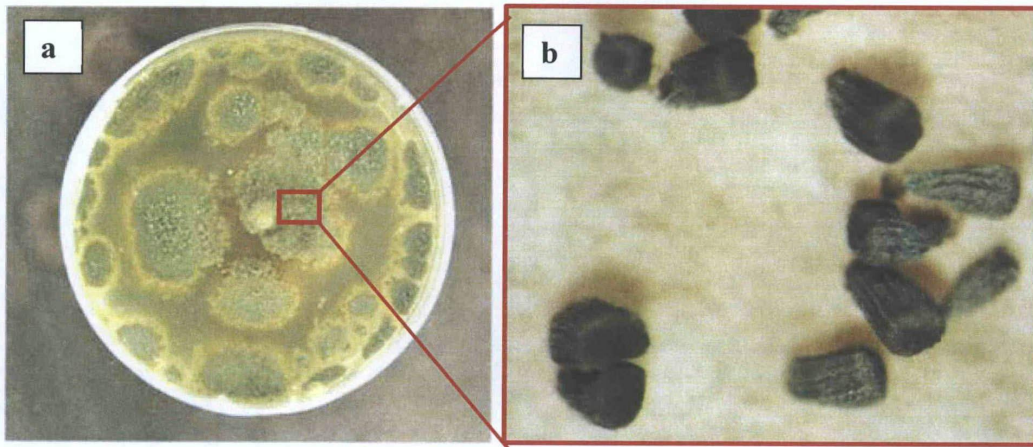


Fig. 4. *Metarhizium bruneum*. a) Cultivo en medio PDA con conidios color verde agregadas en diferentes áreas del plato Petri. b) Agregado de conidios con aumento 5X.

### Experimento 1: Costo de la limpieza de un entomopatógeno para el sistema inmune

#### Inserción de hilo nylon en las hormigas y montaje de subcolonias

Para medir la respuesta inmune de las obreras de *A. cephalotes* se cuantificó el efecto de la encapsulación y melanización en implantes de hilo nylon en el abdomen de las hormigas. Se utilizó una modificación de los métodos de Baer et al., (2006), Cotter et al., (2004) y Couceiro et al., (2016) como se describe a continuación.

Se seleccionó hilo nylon modelo Trilene XL smoothcasting, color transparente, marca Berkley de 0.13 milímetros (mm) de diámetro. Pedazos de hilo nylon de aproximadamente 3 centímetros de largo fueron colocados dentro de un plato Petri esterilizado. Cada pedazo de hilo nylon se limpió con paños de precisión impregnados de etanol 70%, dejándolos secar dentro de un plato Petri con la tapa cerrada. Utilizando pinzas de disección estériles se sostuvieron inmóviles los pedazos de hilo nylon dentro del plato Petri. Mirando a través de un estereoscopio con regla se cortó transversalmente el hilo nylon en pedazos de aproximadamente 0.4 mm de largo (media=0.44, sd=0.055, se=0.002) con un cúter. Los pedazos de hilo nylon se mantenían en el plato Petri cerrado con parafilm, y eran irradiados con luz de un bombillo ultravioleta en una cámara de flujo laminar antes de ser usados.

Para este experimento se usaron 7 colonias de *A. cephalotes*. De cada colonia se escogieron 60 obreras medianas (ancho de cabeza= 2.04 milímetros, sd= 0.18, se= 0.009). Se evitó seleccionar obreras que hayan terminado la fase de pupa horas antes del experimento, las cuales eran identificadas por presentar cutícula suave de color claro y poca movilidad en comparación al resto de las obreras. Las obreras seleccionadas fueron colocadas en un contenedor plástico usando pinzas estériles.

Una a una, las hormigas fueron sometidas a una microcirugía. Se inmovilizaron sosteniéndolas por las pleuras torácicas gentilmente con la yema de los dedos. Bajo el estereomicroscopio se les realizó una herida con una aguja hipodérmica estéril (tamaño 30G x 1/2"-12 x 0.3mm) entre el tergito 4 y 5 del abdomen. Con una pinza de disección estéril se sostuvo un pedazo de hilo nylon (~0.4mm x 0.13 mm) desde un extremo, introduciendo el otro extremo del nylon por el orificio perforado con la aguja dentro del

abdomen de las hormigas. Habiendo finalizado los implantes de hilo nylon se formaron subcolonias de 20 hormigas con implante provenientes de una misma colonia. Cada subcolonia era montada en un plato Petri y constaba de 20 hormigas con implante de nylon, 0.5 gramos de hongo simbionte apilado en el centro del plato y papel toalla húmedo para mantener la humedad (Fig. 5)

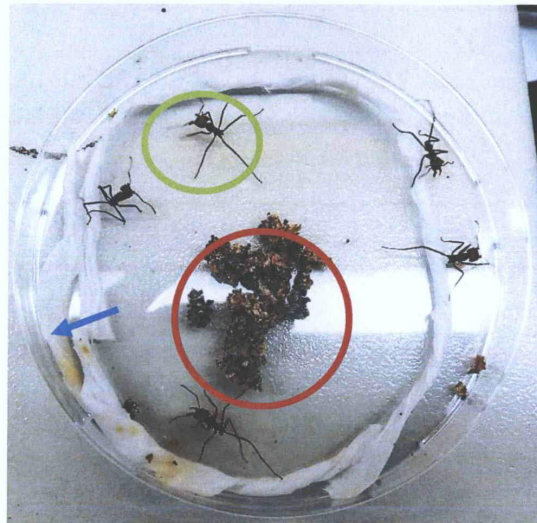


Fig. 5. Subcolonia. Plato Petri con hormigas (círculo verde), hongo simbionte (círculo rojo), papel toalla húmedo (flecha azul).

### Tratamientos y control

Para entender el costo del comportamiento de limpieza de los conidios de *M. brunneum* en la respuesta inmune de las hormigas, se realizaron 2 tratamientos en los que se inocularon conidios de *M. brunneum* a subcolonias de *A. cephalotes* en diferentes tiempos.

Tratamiento 21 horas: Desde el momento en que se montaron las colonias se tomó el tiempo con un cronometro y se asignó a este momento como tiempo 0 horas. Las subcolonias fueron colocadas inmediatamente en una caja plástica a ~25 grados centígrados y permanecieron sin disturbar durante 21 horas. Habiendo transcurrido 21 horas las subcolonias se inocularon con  $\sim 4.6 \times 10^6$  conidios de *M. brunneum*. Los conidios fueron extraídas de un cultivo puro y se aplicaron sobre el hongo simbiote de las subcolonias para estimular la respuesta de limpieza de las hormigas. Se esperó 3 horas a que las hormigas limpiaran los conidios. Como parte de la limpieza las hormigas se acicalaban a sí mismas, al hongo simbiote y las otras obreras. Según (Little et al., 2003) cuando las hormigas acicalan, empaquetan detritos, conidios de patógenos y otros elementos nocivos en su cavidad infrabucal, formando un paquete de material recolectado llamado “pellet”, el cual posteriormente descartan. Habiendo transcurrido 24 horas desde el inicio del experimento las hormigas fueron sacrificadas y los pellets producidos por las hormigas fueron recolectados del plato Petri con una aguja estéril.

Para entender los esfuerzos de limpieza de las hormigas y corroborar que estuvieran limpiando los conidios de *M. brunneum* los pellets recolectados fueron contados y se dejaron germinar en agar PDA. Durante los siguientes 10 días se revisaron los pellets



buscando crecimiento de *M. brunneum* como confirmación visual de la presencia o inhibición del entomopatógeno en los pellets.

A las hormigas sacrificadas se les separaba el gáster del resto del mesosoma rompiendo el peciolo. Usando un estereomicroscopio para observar adecuadamente la ubicación del nylon, se rompió la membrana pleural del gáster. Con ayuda de pinzas de disección se extraía el implante y se colocaba este en un portaobjetos limpio. Este procedimiento se repitió con cada una de las hormigas de cada subcolonia

Tratamiento 0 horas: Se inocularon  $\sim 4.6 \times 10^6$  conidios de *M. brunneum* al tiempo 0 horas. Se esperó 3 horas a que las hormigas limpiaran los conidios inoculados. Habiendo transcurrido 3 horas, los pellets producidos fueron recolectados y puestos a germinar como se describió en el tratamiento anterior. Las hormigas de una misma subcolonia se movieron de los platos Petri con conidios a un nuevo plato Petri con hongo simbionte y papel toalla húmedo sin conidios. Se colocaron las subcolonias en una caja plástica sin disturbar durante 21 horas. Pasadas 24 horas desde el inicio del experimento las hormigas fueron sacrificadas y el implante de nylon removido como se describió en el tratamiento 21 horas.

A las subcolonias usadas como control no se le aplicaron conidios de *M. brunneum*. Al final del periodo de 24 horas no se encontraron pellets en los platos. Las hormigas fueron sacrificadas y el implante de nylon extraído como en los tratamientos anteriores (Fig. 6).

Los implantes de nylon habían sido previamente colocados en un portaobjetos y se hizo pasar luz desde el foco de la base utilizando la intensidad máxima de la perilla, se usó la opción de fondo B.F. y magnificación de lente 5X.

La fotografía se tomó con un microscopio marca Nikon modelo SMZ800, con cámara acoplada marca Nikon modelo DS-Fi1, utilizando el software NIS Elements Imaging software versión 4.0 nikon 32 bits. Los parametros del software fueron: resolution: fast (focus) 1280x960, quality capture 2560x1920, mode: manual, exposure: 40ms y 30ms, gain:1x, contrast: low. Todas las fotos fueron tomadas con la opción de regla digital incluida en el software. Las fotos fueron guardadas en formato Tagged Image File Format (TIF).

### **Análisis de imágenes**

Todas las fotografías de los hilos nylon fueron analizadas con el programa de computadora ImageJ versión 1.50b, desarrollado por el National Institute of Health, USA (Schneider et al., 2012). Se utilizó la herramienta de polígono para seleccionar el área que correspondía al hilo nylon en cada fotografía. Con la herramienta medir se calculó la media, mínimo, máximo de grises, el área de selección y la longitud del nylon usando la escala de conversión de 1032 pixeles por milímetro.

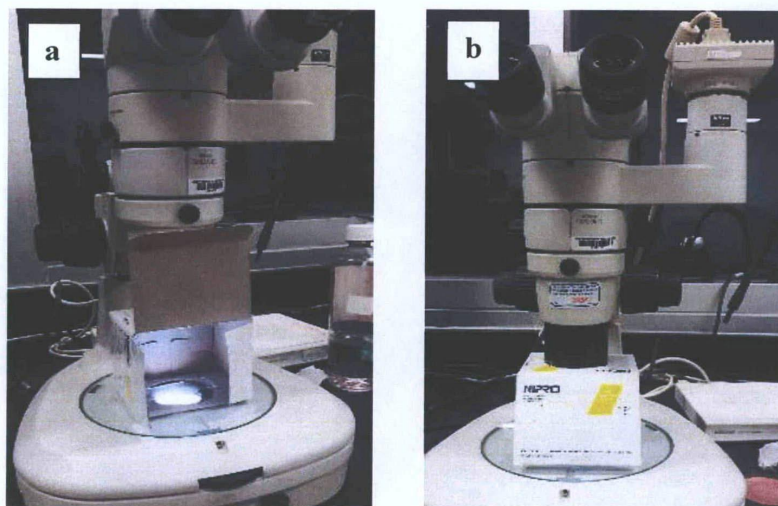


Fig. 7. Estéreo microscopio con caja acoplada. A) Caja con tapa abierta con portaobjetos adentro. B) Caja cerrada con tapa cerrada.

### **Análisis estadístico**

El número de pellets producidos, pellets germinados a los 10 días y porcentaje de germinación entre los tratamientos 0 horas y 21 horas fueron analizados con pruebas de suma de rangos de Wilcoxon con un intervalo de confianza al 95%. Como el control no presentó pellets no se tomó en cuenta para los análisis de producción de pellets.

Para analizar los resultados de melanización de los implantes de hilo nylon en los tratamientos 0 hora, 21 horas, y control se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%. Posteriormente se hizo una comparación por pares con las pruebas post-hoc Tukey's HSD (honestly significant difference) y Fisher's Least Significant Difference Test (LSD test).

La prueba ANOVA requiere de comprobar que los datos tengan homogeneidad de varianza y que los residuos producto de la ANOVA estén normalmente distribuidos. Se realizó la prueba de Levene con un intervalo de confianza del 95% que mostró que los datos presentaban homogeneidad de varianza ( $F=0.297$ ,  $p=0.74$ ). La distribución de los residuos se comprobó utilizando el método visual (Fig. 8) y utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección Lilliefors con un intervalo de confianza al 95% ( $D=0.0499$ ,  $p=0.064$ ), mostrando por ambos métodos una distribución normal de los residuos. Se usó el software R y los paquetes car, agricolae y stats (R Development Core Team, 2018).

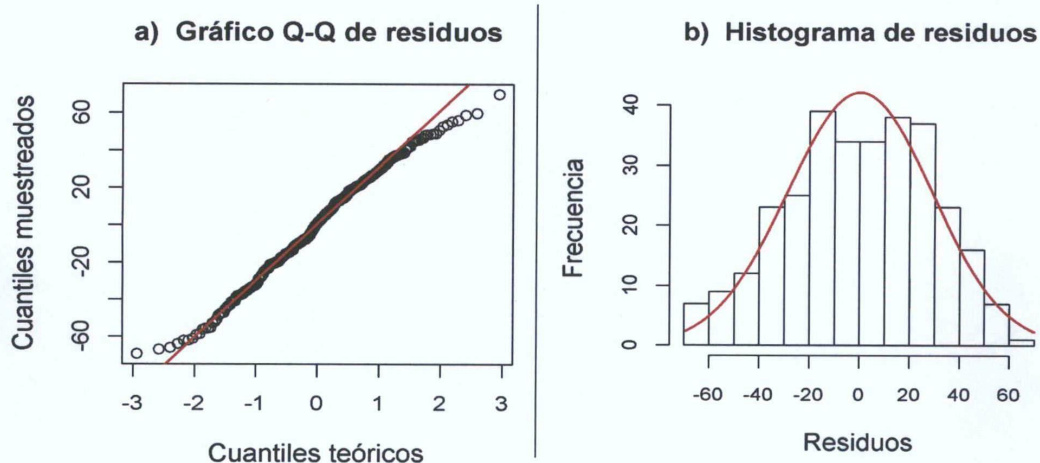


Fig. 8. Distribución de residuos producto de una prueba de analisis de varianza (ANOVA) en . a) Grafico Q-Q. b) Histograma.



## **Experimento 2: Supervivencia de obreras a una infección con entomopatógenos al comprometer el sistema inmune.**

### **Ajuste de la concentración de conidios de *M. brunneum***

Como no se conocía la virulencia de la cepa de *M. brunneum* utilizada se decidió hacer un experimento de prueba con diferentes concentraciones de conidios de *M. brunneum*. Esto se realizó para encontrar una dosis optima matara aproximadamente al 50% de los individuos durante el periodo de observación.

Para esta prueba se utilizaron 3 colonias de *A. cephalotes*. A 30 obreras (10 por cada colonia) se les aplicó una de las siguientes concentraciones de conidios de *M. brunneum*:  $1.3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ,  $1.3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  y  $1.3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Utilizando pinzas, las hormigas fueron sumergidas en tubos ependorf que contenían la solución de conidios. Luego fueron colocadas en papel filtro para escurrir el exceso de conidios y líquido. Las hormigas fueron individualmente transferidas a platos Petri cada una con 0.5 gramos de hongo simbionte y papel toalla húmedo. Fueron monitoreadas a diario durante un lapso de 6 días y se registró el número de individuos muertos por cada día. Debido a que el agua del papel toalla se evaporaba, cada 2 días se les añadía agua. También se les proveía de nuevo hongo simbionte a las colonias que presentaban hongo simbionte seco o enfermo. Aunque cambiar el hongo simbionte de algunas subcolonias en vez de cambiar sistemáticamente el hongo simbionte de todas podría significar una fuente de error, se hizo de esta manera para evitar

exponer a todas las hormigas al estrés de la manipulación que involucraba cambiar el hongo simbiote.

Con los resultados de la prueba se realizó una curva de supervivencia para comparar la mortalidad de las hormigas a través de los 6 días. También se realizó la prueba no paramétrica Log-rank para identificar diferencias entre las curvas de supervivencia (Kleinbaum & Klein, 2010), usando la función `pairwise_survdif` del paquete `survminer`. Se decidió usar la prueba Log Rank debido a que es una prueba que por no ser paramétrica no tiene que lidiar con la distribución de los residuos. Además, se ha usado antes para calcular diferencias en curvas de supervivencia en experimentos con hormigas cortadoras de hojas (Dornelas et al., 2017).

Los resultados de la prueba indican que al final de los 6 días de observación hubo un 100% de mortalidad para la concentración  $1.3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$  conidios, hubo un 90% de mortalidad en  $1.3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  conidios, mientras que en hubo un 63% de mortalidad en  $1.3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  conidios (Fig. 9).

La prueba Log Rank con intervalo de confianza del 95% indicó las 3 curvas son diferentes las unas con las otras (pairwise comparison,  $p = < 0.05$ ). Tomando en cuenta esta información se decidió usar para el experimento la concentración  $1.3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  debido a que fue la menos letal y es donde se va a poder medir la mortalidad de las hormigas durante mas días para ver diferencias entre los tratamientos.

le infligió ningún tipo de daño. Una vez las hormigas tuvieran el nylon o la herida se les dejaba cicatrizar la herida por 20-30 min y entonces eran sumergidas por 2 segundos en la solución de agua, tween20 (agente) al 0.05% y conidios de *M. brunneum*  $1.3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ . Se dejaban escurrir en papel filtro y eran colocadas de manera individual en platos Petri con papel toalla húmedo y 0.4 gramos de hongo simbionte.

Como control se utilizaron hormigas ilesas, heridas y con nylon pero sin ser expuestas a *M. brunneum*. Se utilizó el mismo procedimiento anteriormente descrito para insertar el nylon y provocar la herida, pero en vez de sumergir a las hormigas en una solución de conidios de *M. brunneum*, las hormigas fueron sumergidas en una solución de agua con tween20 al 0.05%.

Las hormigas fueron observadas durante un periodo de 10 días en los cuales se registró a diario los individuos muertos. Cada 2 días se les proveía a las hormigas de agua si el papel toalla estaba secándose y se les reemplazaba el hongo simbionte si el original se veía seco o enfermo.

Para corroborar que las hormigas murieron por efecto del *M. brunneum*, se esterilizaron los cadáveres usando una adaptación de los protocolos utilizados por Cito et al., (2014); Llácer et al, (2013), Quesada-Moraga, (2008); y Dornelas et al., (2017). Los cadáveres fueron sumergidos en una batería de esterilización que consistía en etanol 70% por 10 segundos, agua destilada estéril por 10 segundos, hipoclorito de sodio 3% por 60 segundos, y 3 tubos con agua destilada estéril por 10 segundos cada uno.

Posteriormente los cadáveres estériles eran colocados en platos Petri con papel filtro húmedo para ver si había crecimiento *M. brunneum* a manera de corroborar que las hormigas murieron a causa del hongo entomopatógeno. Se eliminaron del análisis las hormigas de cuyos cadáveres no creció *M. brunneum*.

### **Análisis estadístico**

Al igual que se hizo con la prueba para el ajuste de la concentración de conidios de *M. brunneum*, para este experimento se realizó una curva de supervivencia para los 6 diferentes tratamientos y cada curva fue comparada con cada una de las otras (pairwise comparison) con una prueba Log Rank al 95% de intervalo de confianza.



## RESULTADOS

### Experimento 1: Costo de la limpieza de un entomopatógeno para el sistema inmune

En las subcolonias con tratamiento 21 horas se recolectaron un total de 80 pellets (media por subcolonia= 11.42, se= 2.3) de los cuales germinaron 23 (media por subcolonia= 3.28, se= 1.71). Mientras que en las subcolonias con tratamiento 0 horas se recolectaron un total de 78 pellets (media por subcolonia= 11.14, se= 1.4) de los cuales germinaron 30 (media por subcolonia= 4.28, se= 1.80; Fig. 10). El porcentaje de germinación de los pellets del tratamiento 21 horas (media por subcolonia = 29.48, se=12.91) fue muy similar al porcentaje de germinación de los pellets recolectados a 0 horas (media por subcolonia= 30.54, se=12.07; Fig. 11). Los controles no produjeron pellets visibles a lo largo del experimento.

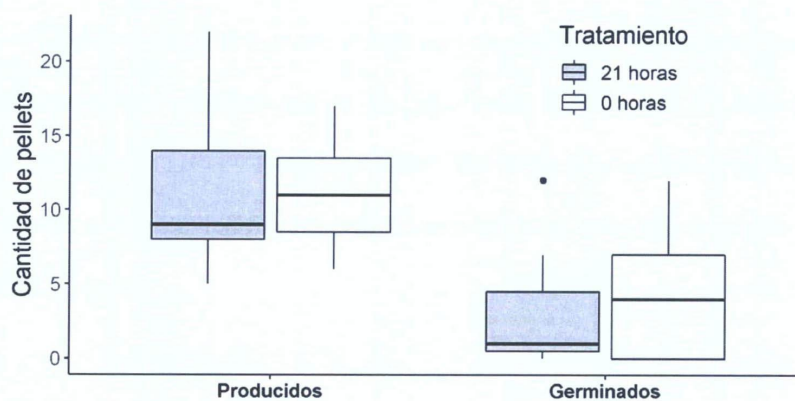


Fig. 10. Pellets producidos (izquierda) y germinados (derecha) en subcolonias inoculadas con con *M. brunneum* a 0 y 21 horas.

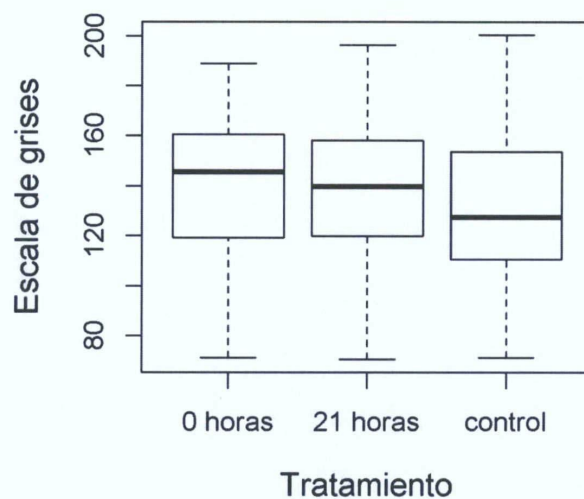


Fig. 12. Escala de grises de hilos nylon de los tratamientos 0 horas, 21 horas y control.

Cuadro 1. Resultados de análisis post hoc de la escala de grises de los tratamientos 0 horas, 21 horas y control. a) Tukeys HSD y b) LSD

a) Tukey's HSD

	Valor p
0h-21h	0.737
control-21h	0.173
control-0h	0.04

b) LSD (Least significant difference)

Tratamiento	Escala de grises	grupo
0 horas	140.43	a
21 horas	137.28	ab
control	130.27	b

**Experimento 2: Supervivencia de obreras a una infección con entomopatógenos al comprometer el sistema inmune.**

Hormigas de los tratamientos con nylon, herida e ileso sin inoculación de *M. brunneum* no mostraron una supervivencia diferente entre sí. Sin embargo, mostraron una supervivencia mayor que todos los tratamientos expuestos a *M. brunneum* (Fig. 13). De las hormigas inoculadas con *M. brunneum* solamente las que poseían nylon mostraron una supervivencia significativamente más baja que las hormigas ilesas (Cuadro 2).

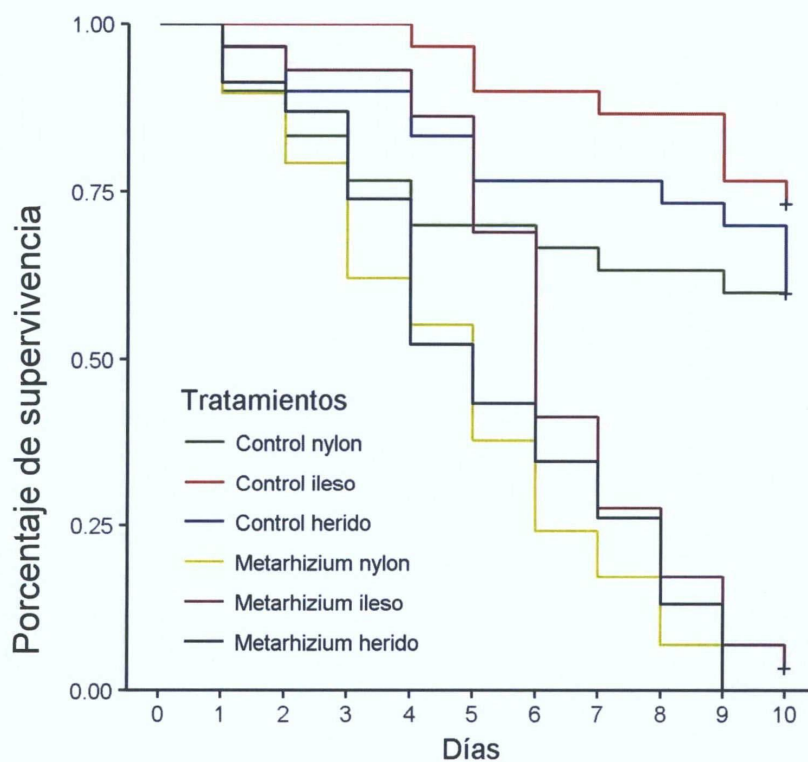


Fig. 13. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de obreras de *A. cephalotes* expuestas a 6 diferentes tratamientos durante un periodo de 10 días.

Cuadro 2. Valores de p de la comparación por pares usando la prueba Log Rank test a 0.05 de significancia. Valores < 0.05 marcados en negrita.

Inoculación	Tipo de herida	Control			<i>M. brunneum</i>	
		Ileso	Nylon	Herida	Nylon	Ileso
Control	Nylon	0.15763	-	-	-	-
	Herida	0.23821	0.78592	-	-	-
<i>M. brunneum</i>	Nylon	<b>3.70E-12</b>	<b>6.86E-06</b>	<b>1.91E-08</b>	-	-
	Ileso	<b>1.72E-09</b>	<b>0.00026</b>	<b>3.62E-06</b>	<b>0.02316</b>	-
	Herida	<b>8.66E-11</b>	<b>6.72E-05</b>	<b>2.42E-07</b>	0.43061	0.16898

## DISCUSIÓN

Encontré que obreras de *A. cephalotes* presentan una disminución de la capacidad de encapsular y melanizar al estar expuestas y limpiando conidios de *M. brunneum*. Este resultado muestra que existe un costo en las estrategias de limpieza que recae sobre algunos elementos de la inmunidad innata.

Se ha cuantificado el costo metabólico de algunas estrategias de inmunidad social como la síntesis y uso de compuestos de las glándulas metapleurales, si la abertura de la glándula es cerrada esto reduce los costos metabólicos de la respiración celular ~13-20% (Poulsen et al., 2002). También se conoce que comprometer el sistema inmune con un implante de hilo nylon aumenta en un 8% la tasa metabólica en pupas de una especie de mariposa (Freitak et al., 2003). Elementos de la inmunidad social y la inmunidad innata pueden ocurrir en un mismo tiempo, ambos conllevando un costo metabólico. Por ejemplo, existe evidencia empírica de una solución de compromisos entre la inmunidad innata e inmunidad social. Escarabajos subsociales del género *Nicrophorus* presentan una menor actividad inhibitoria de sus secreciones antimicrobiales cuando los individuos cicatrizan una herida (Cotter et al., 2013).

Procesos evolutivos han seleccionado la aparición de estrategias defensivas cooperativas como: aplicación de sustancias antimicrobiales (Fernández-Marín et al., 2015), fiebre de la colonia (Starks et al., 2000), barreras pasivas como la inmunidad organizacional y división de labores (Stroeymeyt et al., 2014), disposición de cadáveres (Sun y Zhou, 2013), medicación (Bos et al., 2015), entre otras. Mientras que la respuesta celular disminuye en



insectos sociales cuanto más grande sea el tamaño de sus colonias (López-Urbe et al., 2016) y el número de genes inmunes disminuye en algunos linajes sociales (Evans et al., 2006; Suen et al., 2011).

Es muy probable que, por la teoría del sistema inmune relajado en insectos sociales (Evans et al., 2006), este costo en la capacidad de encapsular y melanizar no sea un problema pagarlo al tener en cuenta que estrategias como los comportamientos que son parte de la inmunidad social sean más importantes para prevenir la proliferación de las enfermedades. Ya que la si la inmunidad social incrementa la competencia de la colonia debería ser una característica seleccionada (Cremer et al., 2007; Cremer et al., 2018). Otti et al. (2014) han propuesto unificar todas las estrategias defensivas empleadas por los individuos de la colonia como una sola inmunidad, teniendo en cuenta que sin importar que sean respuestas sociales o innatas tienen un costo para el individuo y son parte del fenotipo de la colonia.

Mi segundo experimento mostró que comprometer el sistema inmune redujo la supervivencia de *A. cephalotes*. Dornelas et al., (2017) obtuvieron resultados similares. Cuando inmunosuprimieron elementos del sistema inmune innato humoral de la hormiga *Atta sexdens* con el compuesto ciclosporin A, y encontraron que disminuía la supervivencia en infecciones con *Metarhizium* sp.

Exponer el sistema inmune de un individuo con una dosis sub letal de un parásito puede aumentar la supervivencia del individuo ante una segunda infección, este proceso se llama “immune priming”. Wu et al., (2014) intentaron inducir immune priming en larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1756), sus resultados sugieren que después de exponer al sistema inmune de las larvas a bacterias muertas con calor, aumenta la supervivencia de

los individuos en una segunda infección con diferente tipo de patógeno, por lo que no encontraron especificidad, lo que probablemente significa que el sistema inmune responde a la primera exposición y queda activado por unos días para enfrentar la segunda infección. En mi experimento el implante de nylon no parece haber iniciado una acción prematura no específica del sistema inmune que aumentara la supervivencia de las hormigas contra *Metarhizium brunneum*.

Por otro lado, existe evidencia de algunos comportamientos de hormigas adultas infectadas que interactúan menos con el resto de la colonia, se vuelven más agresivas o pasan más tiempo fuera del nido (Bos et al., 2012). Se ha visto el caso en que pupas infectadas con entomopatógenos liberan señales químicas que las obreras pueden saber si están enfermas y proceden a desmembrar a los individuos enfermos y aplicar veneno para desinfectar (Pull et. al., 2018). Por lo que existen escenarios en la naturaleza en que se ve menos indispensable montar una respuesta inmune el sistema para mantener a un individuo vivo.

Aunque experimentalmente los resultados muestran costos en el uso del sistema inmune de las hormigas, es posible que estos costos sean contrarrestados por estrategias de defensa o inmunidad colectiva contra patógenos.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

Existe un costo en limpiar los conidios del entomopatógeno que se vió reflejado en una disminución de la capacidad de melanizar los implantes de nylon cuando las hormigas fueron inicialmente expuestas *M. brunneum*. El esfuerzo de limpieza fue el mismo (pellets producidos y germinados) para hormigas expuestas al entomopatógeno al inicio de un lapso de 24 horas como para las hormigas expuestas al final de un lapso de 24 horas. Esto muestra constancia en el esfuerzo de limpieza a lo largo de la infección.

Comprometer el sistema inmune redujo la supervivencia de las hormigas durante una infección con entomopatógeno. Sin embargo, comprometer el sistema inmune no redujo la supervivencia de hormigas sin infección con entomopatógeno. Lo que significa que existe un costo reflejado en la supervivencia de los individuos.

## RECOMENDACIONES

Ajustar la concentración de conidios de *Metarhizium brunneum* los más cercano posible a una dosis letal media. De lo contrario si la dosis de conidios es muy alta las hormigas morirán muy rápido y no se podrán apreciar diferencias entre los tratamientos.

Estandarizar la edad de las obreras, ya sea usando colorimetría o usando una cohorte de la misma edad.

## **CAPITULO VI**

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- BAER, B., ARMITAGE, S. A., & BOOMSMA, J. J. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature*, 441(7095), 872.
- BECKAGE, N. E. 2007. Insect immunology. Academic press. 360pp.
- BOMAN, H. G., & HULTMARK, D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 103-126.
- BOLTON, B. 2018. An online catalog of the ants of the world. Available from <http://antcat.org>. (accessed [1 de Julio, 2018])
- BOS, N., LEFEVRE, T., JENSEN, A. B., & D'ETTORRE, P. 2012. Sick ants become unsociable. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(2), 342-351.
- BOS, N., SUNDSTRÖM, L., FUCHS, S., & FREITAK, D. 2015. Ants medicate to fight disease. *Evolution*, 69(11), 2979-2984.
- BULET, P., HETRU, C., DIMARCQ, J. L., & HOFFMANN, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4-5), 329-344.
- CHAPMAN, R. E., & BOURKE, A. F. 2001. The influence of sociality on the conservation biology of social insects. *Ecology Letters*, 4(6), 650-662.
- CITO, A., MAZZA, G., STRANGI, A., BENVENUTI, C., BARZANTI, G. P., DREASSI, E., TURCHETTI, T., FRANCARDI, V., & ROVERSI, P. F. 2014. Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhynchophorus ferrugineus*. *FEMS Microbiology Letters*, 355(2), 108-115.
- COTTER, S. C., HAILS, R. S., CORY, J. S., & WILSON, K. 2004. Density-dependent prophylaxis and condition-dependent immune function in Lepidopteran larvae: a multivariate approach. *Journal of Animal Ecology*, 73(2), 283-293.
- COTTER, S. C., LITTLEFAIR, J. E., GRANTHAM, P. J., & KILNER, R. M. 2013. A direct physiological trade-off between personal and social immunity. *Journal of Animal Ecology*, 82(4), 846-853.
- COUCEIRO, J. D. C., MARCELINO, W. L., AMARAL, K. D., GANDRA, L. C., DE SOUZA, D. J., & DELLA LUCIA, T. M. C. 2016. Effects of entomopathogenic fungi on the mortality and immune system of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 161(2), 152-159.
- DAWKINS, R., & KREBS, J. R. 1979. Arms races between and within species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 205(1161), 489-511.

DORNELAS, A. S. P., SARMENTO, R. D. A., PEDRO-NETO, M., SILVA, D. G. D., SANTOS, G. R. D., NASCIMENTO, M. O. D., ALMEIDA, C., & SOUZA, D. J. D. 2017. Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(2), 133-136.

ENGEL, M. S., GRIMALDI, D. A., & KRISHNA, K. 2009. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates*, 1-27.

EVANS, J. D., ARONSTEIN, K., CHEN, Y. P., HETRU, C., IMLER, J. L., JIANG, H., KANOST, M., THOMPSON, G.J., ZOU, Z., & HULTMARK, D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H., NASH, D. R., HIGGINBOTHAM, S., ESTRADA, C., VAN ZWEDEN, J. S., D'ETTORRE, P., WCISLO, W.T. & BOOMSMA, J. J. 2015. Functional role of phenylacetic acid from metapleural gland secretions in controlling fungal pathogens in evolutionarily derived leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. B*, 282(1807), 20150212

FREITAK, D., OTS, I., VANATO, A., & HÖRAK, P. 2003. Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(2), 220-222.

HAJEK, A. E., & ST. LEGER, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39(1), 293-322.

HAMILTON, W. D. 1987. Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution. In *Animal Societies: Theories and Facts*, ed. Y. Ito, J. L. Brown & J. Kikkawa, pp. 81-102. Tokyo: Japan Science Society Press.

HASKINS, C. P., & HASKINS, E. F. 1974. Notes on necrophoric behavior in the archaic ant *Myrmecia vindex* (Formicidae: Myrmeciinae). *Psyche: A Journal of Entomology*, 81(2), 258-267.

HE, S., JOHNSTON, P. R., KUOPKA, B., LOKATIS, S., WEISE, C., PLARRE, R., KUNTE, H. & MCMAHON, D. P. 2018. Termite soldiers contribute to social immunity by synthesizing potent oral secretions. *Insect Molecular Biology*. doi:10.1111/imb.12499

HÖLLDOBLER, B. (1981). Foraging and Spatiotemporal Territories in the Honey Ant *Myrmecocystus mimicus* Wheeler (Hymenoptera: Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol*, 9, 301-314.

HÖLLDOBLER, B., & WILSON, E. O. 2009. *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. 522 pp.

KLEINBAUM, D. G., & KLEIN, M. 2010. *Survival analysis* (Vol. 3). New York: Springer.

KEPLER, R. M., HUMBER, R. A., BISCHOFF, J. F., & REHNER, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829.



- LEE, H., & LEE, D. G. 2015. Mode of Action of Antimicrobial Peptides Identified from Insects. *Journal of life Science*, 25(6), 715-723.
- LLÁCER, E., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C., & JACAS, J. A. 2013. Could sterile males be used to vector a microbiological control agent? The case of *Rhynchophorus ferrugineus* and *Beauveria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*, 103(2), 241-250.
- LORETO, R. G., & HUGHES, D. P. 2016. Disease dynamics in ants: a critical review of the ecological relevance of using generalist fungi to study infections in insect societies. In *Advances in genetics* (94, pp. 287-306). Academic Press.
- LÓPEZ-URIBE, M. M., SCONIERS, W. B., FRANK, S. D., DUNN, R. R., & TARPY, D. R. 2016. Reduced cellular immune response in social insect lineages. *Biology letters*, 12(3), 20150984.
- MORELOS-JUÁREZ, C., WALKER, T. N., LOPES, J. F., & HUGHES, W. O. 2010. Ant farmers practice proactive personal hygiene to protect their fungus crop. *Current Biology*, 20(13), R553-R554.
- NEOH, K. B., YEAP, B. K., TSUNODA, K., YOSHIMURA, T., & LEE, C. Y. 2012. Do termites avoid carcasses? Behavioral responses depend on the nature of the carcasses. *PLoS One*, 7(4), e36375.
- ORTIZ-URQUIZA, A., & KEYHANI, N. O. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357-374.
- OTTI, O., TRAGUST, S., & FELDHAAR, H. 2014. Unifying external and internal immune defences. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(11), 625-634.
- PULL, C. D., UGELVIG, L. V., WIESENHOFER, F., GRASSE, A. V., TRAGUST, S., SCHMITT, T., BROWN, M. & CREMER, S. 2018. Destructive disinfection of infected brood prevents systemic disease spread in ant colonies. *Elife*, 7, e32073.
- QUESADA-MORAGA, E., MARTIN-CARBALLO, I., GARRIDO-JURADO, I., & SANTIAGO-ALVAREZ, C. 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann)(Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 47(1), 115-124.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods*, 9(7): 671-675, PMID 22930834
- SILVA-JOTHY, M. T., MORET, Y., & ROLFF, J. 2005. Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology*, 32, 1-48.
- STARKS, P. T., BLACKIE, C. A., & SEELEY, T. D. 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87(5), 229-231.

- STRAND, M. R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14.
- STROEYMEYT, N., CASILLAS-PÉREZ, B., & CREMER, S. 2014. Organisational immunity in social insects. *Current Opinion in Insect Science*, 5, 1-15.
- SUEN, G., TEILING, C., LI, L., HOLT, C., ABOUHEIF, E., BORNBERG-BAUER, E., & DENAS, O. 2011. The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. *PLoS Genetics*, 7(2), e1002007.
- SUN, Q., & ZHOU, X. 2013. Corpse management in social insects. *International Journal of Biological Sciences*, 9(3), 313.
- TRANTER, C., & HUGHES, W. O. H. 2015. Acid, silk and grooming: alternative strategies in social immunity in ants?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(10), 1687-1699.
- UGELVIG, L. V., KRONAUER, D. J., SCHREMPF, A., HEINZE, J., & CREMER, S. 2010. Rapid anti-pathogen response in ant societies relies on high genetic diversity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1695), 2821-2828.
- VISSCHER, P. K. 1983. The honey bee way of death: necrophoric behaviour in *Apis mellifera* colonies. *Animal Behaviour*, 31 (4), 1070-1076.
- WALKER, T. N., & HUGHES, W. O. 2009. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. *Biology Letters*, rsbl20090107.
- WHEELER, W. 1918. A Study of Some Ant Larvæ, with a Consideration of the Origin and Meaning of the Social Habit among Insects. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 57(4), 293-343.
- WILSON, E. O. 1990. Success and dominance in ecosystems: the case of the social insects. Vol. 2. Oldendorf/Luhe: Ecology Institute.
- Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F., & Pell, J. K. 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4 (6), 637-649.
- WIRTH, R., HERZ, H., RYEL, R. J., BEYSCHLAG, W., & HÖLLDOBLER, B. 2003. Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama. (Vol. 164). Springer Science & Business Media.
- WU, G., ZHAO, Z., LIU, C., & QIU, L. 2014. Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photorhabdus luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 559-569.
- YANAGAWA, A., & SHIMIZU, S. 2007. Resistance of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki to *Metarhizium anisopliae* due to grooming. *Bio Control*, 52(1), 75-85.